

Entamoeba histolytica の枸橼酸脱水素作用の*

細胞化学的観察

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉教授)

詫 摩 一 郎・井 上 千 代 子・川 満 恵 光

たく ま いち ろう いの うえ ち よ こ かわみつ けいこう

(本編の概要に就いては、昭和33年10月24日 (鹿児島), 日本寄生虫学会第11回南日本支部大会に於いて口演発表した)

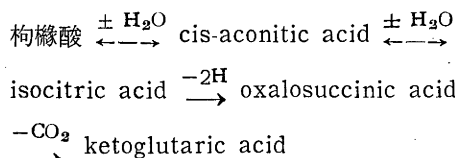
緒

有機物の連鎖につながれている水素は、エネルギーを放出しながら水になるのであるが、その有機的結合水素のエネルギー放出過程が脱水素反応 (dehydrogenation) であつて、生活細胞内で絶えず生起している hydrogen donor から hydrogen acceptor への水素の通伝こそ生命を維持する重要な反応の一である。かゝる生活細胞の終末呼吸に大きな役割を演じていると云われる脱水素作用が原虫のような簡単な生物にもない筈はないと考えられたので、著者等は、別報の如く、赤痢アモエバ (*Entamoeba histolytica*) 虫体に於いて、Semenoff 法、並びに、Wachstein & Meisel 法により、琥珀酸脱水素作用を細胞化学的に証明することができたが、更に、Krebs の trycarboxylic acid cycle (TCA cycle) 回転に関連して、琥珀酸脱水素酵素と共に細胞の代謝に重要な関係を持つ枸橼酸脱水素酵素に着目し、*Entamoeba histolytica* 虫体内における該酵素作用を追求せんと試みた。

動・植物組織に於いて、枸橼酸が迅速に酸化されることの重要な機序が明らかにせられたのは、比較的近年になつてからのことであつて、Martius & Knoop (1937~1938) (Porter に拠る) は、枸橼酸とその塩類の酸化経路が次のようになることを実験的に証

言

明した。



まづ、fumarase に似た monoxidative enzyme が枸橼酸塩を cis aconitic acid を経て iso citric acid とし、これが iso citric dehydrogenase によつて脱水素されると云うのである。この際、2ケの水素原子が離脱されるが、この水素原子による methylene blue の還元脱色作用をもつて、細胞中の酵素の活性を細胞化学的に判定せんとしたのが Follies & Berthrong 法である。Follies & Berthrong (1951) は、軟骨と骨の組織化学的研究に於いて、cytochrome, oxidase, alkaline phosphatase, glycogen, lipid, succinic dehydrogenase 等の観察を行つてゐるが、その際、枸橼酸脱水素酵素 (citric dehydrogenase) の観察方法として、Semenoff 法の琥珀酸に代えるに枸橼酸を以つてし、メチレン青に染まつた細胞顆粒の脱色によつて枸橼酸脱水素酵素の活性を証明した。著者等は、この方法を用いて、*Entamoeba histolytica* 虫体内における枸橼酸脱水素作用の細胞化学的観察を行つた。

* 長崎大学風土病研究所業績 第289号

Fig. 1

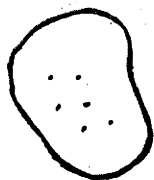


Fig. 9

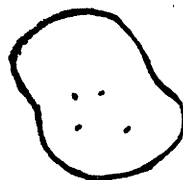


Fig. 2



Fig. 10

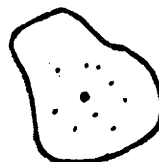


Fig. 3

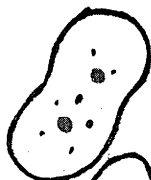


Fig. 11

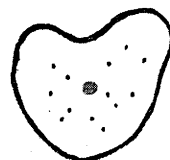


Fig. 4

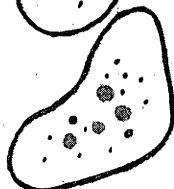


Fig. 12

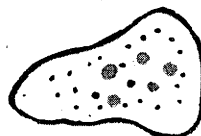


Fig. 5



Fig. 13

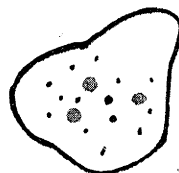


Fig. 6

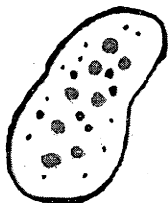


Fig. 14

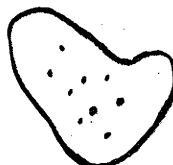


Fig. 7

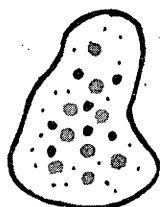


Fig. 15



Fig. 8

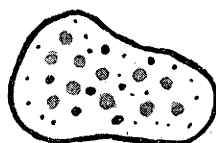
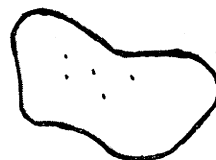


Fig. 16



実験材料並びに方法

供試原虫：— *Entamoeba histolytica* Y株、大阪大学微生物病研究所より分与され、田辺・千葉（5%人血清リンゲル液使用）培地に継代培養しているものである。

Follies & Berthrong (1951)：— 0.05%メチレン青 (methylene blue) 2cc, 0.1M 枸橼酸ソーダ 2cc, pH 7.6 の M/15 磷酸塩緩衝液 6cc を混合して染色液とする。37°C/48時間。田辺・千葉培地培養の虫体を37°C 加温の滅菌リンゲル液を以つて、

600rpm 5分間づつ3回遠心洗滌して、随伴細菌を可及的に洗い去つた虫体浮游液をピペットでスライドガラス上に一滴おき、これに上記染色液数滴を加えてよく混和し、大型カバーガラス (24×24) で覆い、パラフィンで周囲を封じて標本の乾燥を防いで鏡検し、10分間を1期間として、虫体内の細胞化学的所見を描画し、通計2時間の観察を行つた。また、対照実験として、上記染色液から基質である琥珀酸ソーダを取除いた液を調製して用いた。

実験成績

Follies & Berthrong 法による所見：—

(1) 対照実験では、最初の10分～20分間に、虫体内形質 (endoplasm) 中に、宛も砂を播いたように、青染する微細な顆粒が10個程度出現し (Fig. 1～3)、時間の経過と共に増加し、青色の濃度を増して鮮明になり、40分～50分間で顆粒の数は最高の状態 (20～30個程度) に達し (Fig. 4)、また、微細青染顆粒の他に、中等大の濃青染の顆粒と円形粗大の淡青色の顆粒も出現する (Fig. 5)。これ等の顆粒は、虫体の運動に従つて、内形質物質と共に流動転々して止まることがない。爾後、青染状態を保つて推移し (Fig. 6～7)、2時間後にも脱色することがなかつた (Fig. 8)。外形質 (ectoplasm) には青染顆粒の出現は見られず、また、核の所在は判然としなかつた。

(2) 基質液に枸橼酸ソーダを混合した場合で

は、最初の30分間は、大体に於いて、対照例と同様に、20個前後の青色の顆粒が散在して現われて来るが (Fig. 9～12)、40分～50分頃より次第に青色に染まつた顆粒群の脱色が始まり、微細青染顆粒、中等大濃青染顆粒、円形粗大淡染顆粒は時間の経過と共に消失して見られなくなり (Fig. 13～15)、2時間後には、大体、微細な青染顆粒が5～6個残るのを見るだけとなつた (Fig. 16)。

琥珀酸ソーダの場合と比較して、青染顆粒の出現は幾分少なく、淡染粗大顆粒は3～5個を出ない。勿論、外形質 (ectoplasm) には青染顆粒の出現は見られず、また、実験当初から死んでいたと思われるアメーバ虫体は、全体が青染されたままで、2時間を通じて脱色されなかつた現象は、琥珀酸ソーダ混入の場合と同であつた。

考察及び結語

Follies & Berthrong 法は、Semenoff 法に於ける琥珀酸ソーダを枸橼酸ソーダに代えて、一旦メチレン青で染まつた細胞顆粒の還元脱色によつて枸橼酸脱水素酵素の存在を証明する方法であつて、著者等は、*Entamoeba histolytica* に初めて之を試みた。枸橼酸ソーダを混入した染色液によれば、一旦青染した顆粒が一定時間後に明瞭な脱色を示すし、枸橼酸ソーダを混入しない対照実験ではメチレン青の還元脱色が見られないのであら、それは枸橼酸が脱水素されたことを細胞るか化学的に示すものであると考えてもよいであろう。しかし、Wachstein & Meisel

法の琥珀酸を枸橼酸に代えて実験すると、明確な所見を得難いので、*Entamoeba histolytica* の枸橼酸脱水素作用は琥珀酸脱水素作用ほどには強くないのかも知れない。この一旦青染された後に脱色される顆粒が、細胞内の呼吸酵素を包蔵するといわれるミトコンドリアそのものであるか、或いは、脱水素酵素の存在部位を示すものであるか、今は何とも云えない。

結語：— *Entamoeba histolytica* の枸橼酸脱水素作用を Follies & Berthrong 法によつて著者等は初めて証明した。

擱筆するにあたり、御用篤なる御指導並びに御校閲を賜わった恩師登倉教授に対して、衷心より感謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) **Follies, R. H. Jr., and Berthrong, M. :** Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. Bull. Johns Hopkins Hosp. 85 (4) : 281-298, 1949. (Biol. Abst. 25 (1) : 168, 1951). 2) **Lison, L.** (今泉正 訳) : 組織化学および細胞化学—理論と方法—, 初版, 白水社, 東京. 1954. 3) **Martivs, C., and Knoop, F. :** Z. Physiol. Chem. 246 : 1-11, 1937. (Porter, J. R. : Bacterial Chemistry & Physiology. 610, fifth printing, New York, 1950). 4) **Wachstein, M., and Meisel, E. :** Influence of experimental renal damage on histochemically demonstrable succinic dehydrogenase activity in the rat. : Am. J. Path. 30 : 147-166, 1954.

(昭33. 10. 20 受付)